

## 【要約】

## 修士課程優秀論文

DPP-4阻害薬 anagliptin はマウスにおける肝臓の  
インスリン抵抗性および脂肪肝炎を軽減するDPP-4 inhibitor anagliptin alleviates lipotoxicity-induced hepatic  
insulin resistance and steatohepatitis in mice金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 細胞代謝栄養学  
酒 井 友 梨 子

## はじめに

内臓脂肪の増大は、脂肪組織以外の臓器・組織へ異所性に脂肪を蓄積させ機能障害をもたらすリポトキシシティ（脂肪毒性）を引き起こす<sup>1)</sup>。非アルコール性脂肪肝炎 non-alcoholic steatohepatitis (NASH) は肝臓におけるリポトキシシティであり、単純性脂肪肝の約20%が、肝細胞変性や炎症、線維化を伴うNASHへ進行し、やがて肝硬変・肝癌に至るとされる<sup>2)</sup>。当研究室では、コレステロール、及び飽和脂肪酸の摂取により、肝臓にリポトキシシティを生じる食餌性NASHモデルを独自に開発した。このマウスの肝臓では、脂質合成が亢進し、脂質過酸化の増大やマクロファージ・クッパー細胞の活性化を介し、インスリン抵抗性が惹起され、脂肪化から炎症・線維化へと進展し、ヒトNASHに近い病態と組織像を呈する<sup>3)</sup>。NASHの背景には肥満、糖尿病、脂質異常症などの生活習慣病が存在することが多く、これまでNASH患者を対象にインスリン抵抗性改善薬等による臨床試験が行われてきた。しかし、これら既存の薬剤の有効性は乏しく<sup>4)</sup>、NASHの薬物治療は未だに確立されていない。

Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) は食事による血糖上昇に伴い、消化管から分泌されるGLP-1、GIP等のインクレチンを分解するペプチダーゼである。DPP-4阻害薬は、インクレチンを分解・不活性化するDPP-4の活性を阻害し、血中の活性型インクレチン濃度を増加させインスリンの分泌を促すことから、糖尿病治療薬として広く使用されている<sup>5)</sup>。一方、DPP-4は、免疫細胞を含む様々な細胞表面に広く発現し、多彩な生理作用を有することが知られている。これまでに、肥満患者の脂肪組織では、DPP-4陽性のマクロファージの蓄積が増加し、インスリン抵抗性と正相関すること、また、NAFLD患者では血清DPP-4活性と肝機能値の間に正の相関があることが報告されている。

本研究では、NASHの病態形成や治療標的としてのDPP-4の役割と意義を明らかにするため、DPP-4阻害薬 anagliptin の食餌性NASHモデルに対する影響を検討した。

## 結 果

NASHの肝臓ではDPP-4活性が増加する

C57BL/6Jマウスを通常食 (NC) 群、高脂肪・高コレス

テロール食 (CL) 摂取のNASH群、CL摂取にanagliptinを飲水投与したCL+Ana群に分け、20週間飼育した。NC群に比しCL群では有意に体重が増加した。一方、anagliptinは体重、および摂餌量に影響を与えなかった。またNC群に比し、CL (NASH) 群の血漿、及び肝臓のDPP-4活性は増加したが、anagliptinはCL群で増加した血漿、及び肝臓のDPP-4活性を抑制した。

Anagliptin はNASHの糖代謝異常、肝臓のインスリン抵抗性を改善する

CL群に比し、anagliptinは血漿GLP-1値を2倍に増加させた。NC群に比しCL群では、糖負荷後の血糖値が上昇し、耐糖能異常が認められたがAnagliptinはNASHの耐糖能異常を改善した。さらに、ビルビン酸負荷試験を行い、肝臓からの糖産生への影響を評価すると、NC群に比しCL群ではビルビン酸負荷後の血糖値が上昇し、肝臓からの糖産生が亢進したが、anagliptinは肝糖産生の増加を抑制した。NC群に比しCL群では血漿インスリン値が有意に増加し、高インスリン血症を呈したがanagliptinは絶食および摂食時の血漿インスリン値を用量依存性に低下させた (図1)。さらに、anagliptinはCL摂取により減弱した肝臓のインスリンシグナル (IR $\beta$ , Akt) のリン酸化を回復させた。

Anagliptinは肝臓の脂肪酸合成を抑制し、肝脂肪化を改善する

HE染色により肝病理像を評価したところ、CL群では脂肪沈着、及び炎症細胞浸潤が認められ、NASHの病理像を呈していた。この結果に一致して、肝臓内の中性脂肪、総コレステロール、遊離脂肪酸はCL群では顕著に増加していた。しかし、anagliptinはこれらの脂質蓄積と肝機能値を用量依存性に減少させた。NC群に比しCL群の肝臓では、脂肪酸合成遺伝子の発現が増加していたが、anagliptinはその増加を抑制していた。

AnagliptinはNASHの肝臓における炎症と線維化を抑制する

NASHの肝臓では、自然免疫系が賦活化し常在性マクロファージであるクッパー細胞の活性化により炎症が惹起される。CL群の肝臓において、マクロファージマーカー F4/80陽性細胞が増加していたが、anagliptinにより

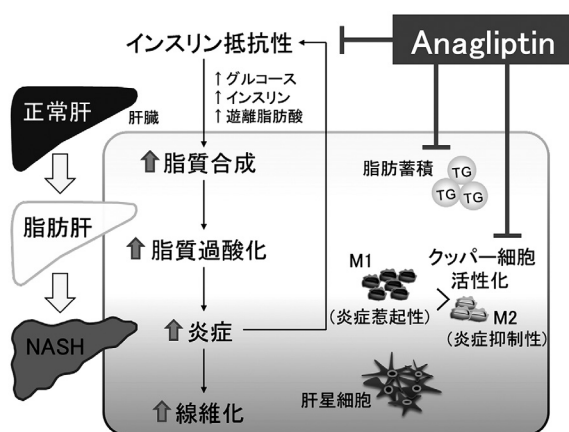


図1. AnagliptinのNASHへの作用

マクロファージの集積は抑制された。さらに、anagliptinはCL摂取により活性化された肝臓のNF- $\kappa$ B, p38MAPK, 及びErkの炎症シグナルを抑制した。肝臓における炎症の遷延は線維化を誘導し、肝硬変へと進展する。CL群では、sirius redにより染色されるコラーゲン線維が増加し、線維化関連遺伝子の発現が増加していた。また、CL群ではコラーゲン線維を産生する肝星細胞の指標である $\alpha$ -SMAの蛋白発現が増加していた。一方、anagliptinは線維化関連遺伝子の発現増加と星細胞の活性化を抑制した。Anagliptinは肝臓のマクロファージ極性をM1からM2優位にシフトさせる

非肥満の代謝臓器（脂肪組織、肝臓等）では主に炎症抑制性M2マクロファージが存在する一方、肥満状態では炎症惹起性M1マクロファージが浸潤し、全身のインスリン抵抗性が誘導される。フローサイトメトリー解析の結果、CD45/CD11b/F4/80陽性細胞として同定したマクロファージはCL群の肝臓において有意に増加した。また、CD11c陽性CD206陰性細胞をM1マクロファージ、CD11c陰性CD206陽性細胞をM2マクロファージとして計数すると、CL群ではM1は増加し、M2は減少していた。対照的にanagliptinはM1を減少させ、M2を増加させた結果、M1/M2比は低下し、M2優位にマクロファージ極性をシフトさせた（図1）。また、NASHの肝臓におけるDPP-4活性とM1/M2比には正の相関が認められた。

AnagliptinはマクロファージのM1活性化を抑制する

Anagliptinによる肝臓の炎症抑制がマクロファージへの直接的な作用であるかを探るため、lipopolysaccharide (LPS) 刺激によりM1活性化を誘導したマクロファージ様RAW264.7細胞を用いて検討した。LPS刺激によりRAW細胞におけるDPP-4活性は約3倍に増加したがanagliptinの添加によりその活性はほぼ完全に抑制された。LPS刺激により炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), 及びケモカインMCP-1の遺伝子発現が増加したが、anagliptinはこれらの発現を濃度依存性に抑制した。さらに、LPS刺激により増加した炎症シグナル分子NF- $\kappa$ B, MAPK (p38 MAPK, ERK, JNK), 及びc-Junのリン酸化を、anagliptinは顕著に低下させ、LPS刺激により減少したNF- $\kappa$ Bの抑制因子I $\kappa$ Bを回復させた。

## 考 察

本研究において、NASHモデルマウスの肝臓では、DPP-4活性が増加した。この食餌性NASHモデルでは、肝臓への選択的なリポトキシシティからマクロファージのM1極性化が促進される一方、脂肪組織の炎症は惹起されないことが分かっており、DPP-4阻害薬の肝臓マクロファージや炎症への影響を評価するのに適したモデルといえる。Anagliptinは、NASH病態におけるマクロファージの蓄積、それに伴う炎症シグナルやサイトカイン発現を抑制した。今後は、肝細胞、星細胞や類洞内皮等におけるDPP-4活性を検討し、NASHの肝臓で増大するDPP-4活性の起源を明らかにする必要がある。

また、anagliptinはNASHの肝臓のM1マクロファージを減少させるのみならず、抗炎症性のM2マクロファージを増加させることが明らかとなった。In vivoでは、anagliptin投与により血中のGLP-1濃度が増加しており、DPP-4阻害による炎症や線維化の抑制はGLP-1を介した作用の結果である可能性は否定できない。しかし、少なくともin vitroでは、DPP-4活性の阻害とM1極性化の抑制の間に相関性を見出している。今後、M1/M2極性の制御におけるDPP-4の役割をより明確にすることで、多くの謎に包まれたNASHの脂肪化から炎症への進展メカニズムの一端を解明していきたい。

## 結 語

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の病態基盤である慢性炎症やインスリン抵抗性においてDPP-4の関与が示唆されている。そこで、DPP-4阻害薬anagliptinの食餌性NASHモデルに与える影響を検討した。1) NASHモデルでは、血漿及び肝臓のDPP-4活性が増加した。2) AnagliptinはNASHにおける耐糖能異常とインスリン抵抗性を改善し、脂肪化・炎症・線維化を抑制した。3) Anagliptinは肝臓のM1マクロファージを減少させる一方、M2マクロファージを増加させており、DPP-4活性とM1/M2比に相関が認められた。以上、anagliptinは、肝臓のマクロファージ極性をM2優位にシフトさせ、炎症およびインスリン抵抗性を減弱しNASHを抑制した。

## 参 考 文 献

- 1) Unger RH, et al. Biochimica et Biophysica Acta 1801: 209-214, 2010
- 2) Cusi K. Gastroenterology 142: 711-725, 2012
- 3) Matsuzawa N, et al. Hepatology 46: 1392-1403, 2007
- 4) Sanyal AJ, et al. N Engl J Med 362: 1675-1685, 2010
- 5) Drucker DJ. Diabetes Care 30: 1335-1343, 2007



### Profile

2014年3月 近畿大学農学部食品栄養学科卒業  
2016年3月 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科医科学専攻修了  
2016年4月～ 現在 金沢学院大学人間健康学部健康栄養学科助手  
2016年4月～ 現在 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科医学専攻